

使用自我感知型 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 测量品牌药和仿制药中的 痕量杂质

作者

Kyle Covert 博士
安捷伦科技公司



摘要

本研究展示了一种比较品牌和仿制非处方 (OTC) 对乙酰氨基酚药物中相关杂质的方法。该工作流程包括 Agilent InfinityLab 液相色谱/质谱选择性检测器 (LC/MSD iQ) 和 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统。本研究鉴定的杂质浓度低于使用 UV 能够可靠检出的浓度。

前言

多数 OTC 药物都是根据品牌产品开发的仿制药，无需处方即可购买。这些仿制药由不同的制造商出售，有助于刺激竞争并降低价格，使患者更容易负担。仿制 OTC 药品生产企业必须满足与 USFDA 针对已批准品牌药确定的规格、纯度、稳定性和相关杂质限度等相同的质量属性^[1]。仿制药品制造商必须能够表征其产品及其杂质，通常使用 HPLC 和 UV 检测。添加质量选择检测器可以大大缩短典型 USP 或 EP 方法的分析时间^[2]，因为共洗脱组分可以由目标化合物的质量明确地确定。

本研究对比了对乙酰氨基酚品牌药和仿制 OTC 药中的相关杂质。使用 InfinityLab LC/MSD iQ 和 1290 Infinity II 液相色谱系统筛查杂质。基于单四极杆技术的 LC/MSD iQ 是一款强大耐用的检测系统，其设计重点是简单易用性和可靠性。这是一款直观的仪器，只需极少的用户培训。它可以采用高液相色谱流速，并能自动优化 MS 参数，以提供最佳结果。使用质谱检测能够确保对活性药物成分 (API) 及其相关杂质，以及更为重要的任何未知或意外杂质进行明确检测。色谱工作人员可以轻松地将 LC/MSD iQ 作为新模块加入现有液相色谱堆栈中。此款仪器经过专门设计，可以轻松集成到 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统、1290 Infinity II 液相色谱系统甚至更旧型号的液相色谱系统中，其空间设计可插入与液相色谱模块相同的电源插座中。包括 MS 和真空泵在内的 HPLC 堆栈可置于

Agilent InfinityLab Flex Bench MS 移动支架上，从而节省了工作台空间，并可快速安全地移动整个系统。

实验部分

标准品与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。甲醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。对乙酰氨基酚 API 其相关杂质和乙酸的标准品购自 Millipore-Sigma (Merck, Darmstadt, Germany)。超纯水产自采用 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。

OTC 药品样品购自当地药店，品牌产品指定为药品 1，仿制产品指定为药品 2。

仪器

LC/MSD iQ 系统包括以下模块：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)
- Agilent LC/MSD iQ (G6160AA)

将 DAD 与 60 mm 安捷伦最大光强卡套式流通池 (G4212-60007) 配套使用，以使 LC/MSD iQ 的 UV 检测获得最大灵敏度。

样品前处理

将选定药物杂质标准品称量至 15 mL Falcon 管中，用甲醇稀释至 1 mg/mL 的工作浓度，然后超声处理约 15 分钟。将 100 µL 每种标准品加入 2 mL 螺口样品瓶中，并用 80:20 甲醇/水稀释至 1 mL。用 80:20 甲醇/水进行连续稀释，以制备以下外部校准曲线的浓度：10、5、2.5、1、0.5 和 0.1 µg/mL。OTC 药物样品为片剂，每片对乙酰氨基酚 (API) 剂量为 500 mg。使用甲醇对 API 及其杂质进行简单的液相萃取。将药物片剂置于包含 10 mL 甲醇的 15 mL Falcon 管中，振荡 30 分钟，超声处理约 30 分钟，然后以 4500 rpm 的转速在离心机中离心约 15 分钟。然后，从 Falcon 管中吸取 1 mL 最终溶液到 2 mL 螺口样品瓶中进行分析，最终 API 浓度为 50 mg/mL。

Agilent OpenLab CDS

使用 Agilent OpenLab CDS 软件进行数据采集、处理和报告。OpenLab CDS 提供法规认证功能，可根据美国 FDA 21 CFR Part 11、欧盟附录 11 及其他类似法规提供数据可靠性支持。1290 Infinity II LC 和 LC/MSD iQ 旨在确保 GxP 实验室常规应用中可靠且稳定的 LC/MS 分析。

结果与讨论

使用 OpenLab CDS 2.4 确定线性校准范围

使用 Agilent OpenLab CDS 2.4 软件生成校准曲线。在 OpenLab CDS 的数据分

析组件中，用户可以轻松查看校准曲线（图 1），并将此数据存储起来，以对测试样品进行自动和快速定量。生成标准品杂质六个浓度的外部校准曲线：0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0 µg/mL，重复测量

三次。上述浓度相当于样品中的 2、10、20、50、100 和 200 ppm API。选择该范围以包含药物样品中的预期杂质浓度。图 2 显示了校准曲线，所有目标化合物校准曲线的 $R^2 > 0.99$ 。

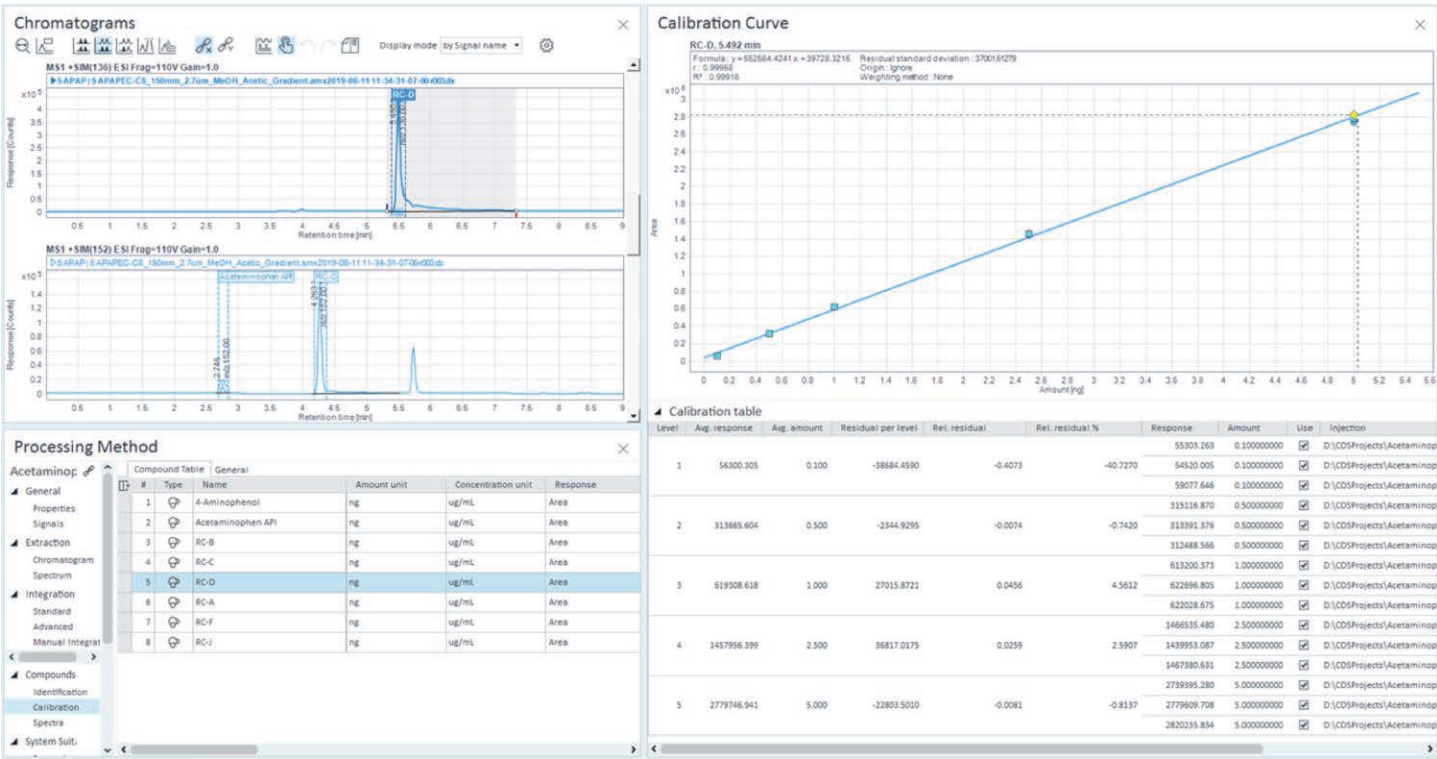


图 1. Agilent OpenLab CDS 的“数据分析”组件界面，及打开的校准曲线选项卡界面。用户可以同屏轻松查看色谱图和校准曲线，并选择校准曲线（可实时更新运算）

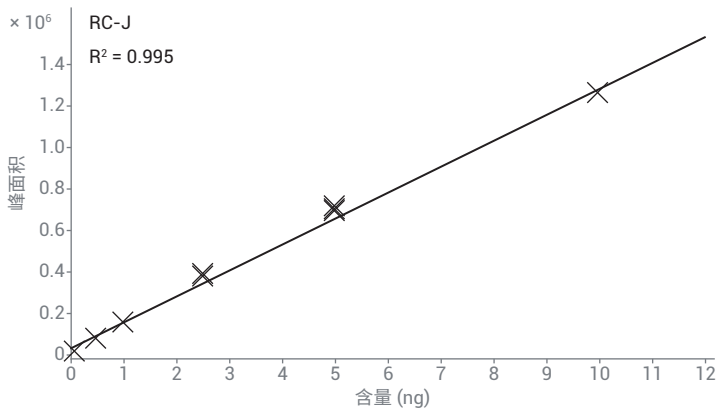
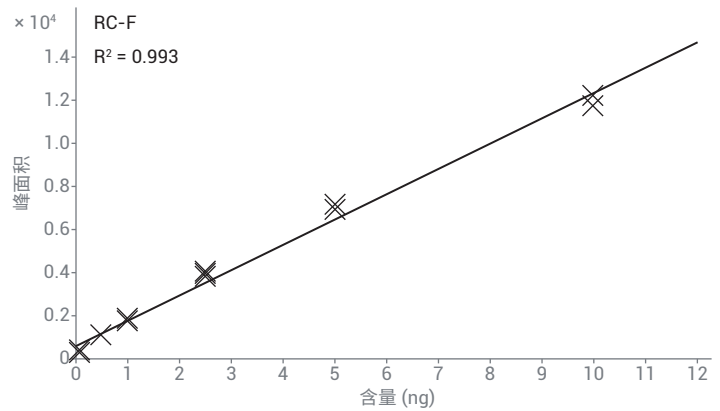
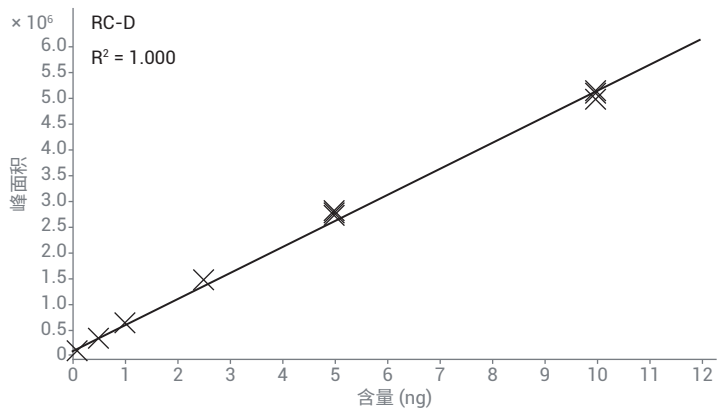
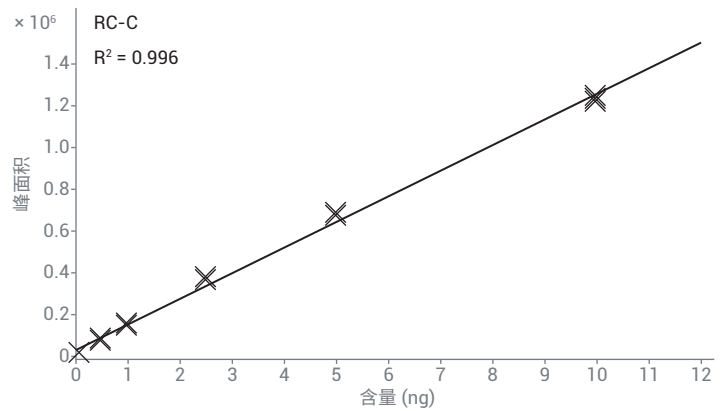
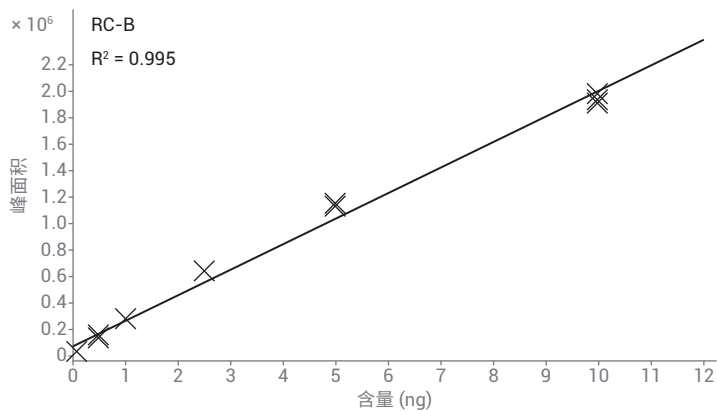
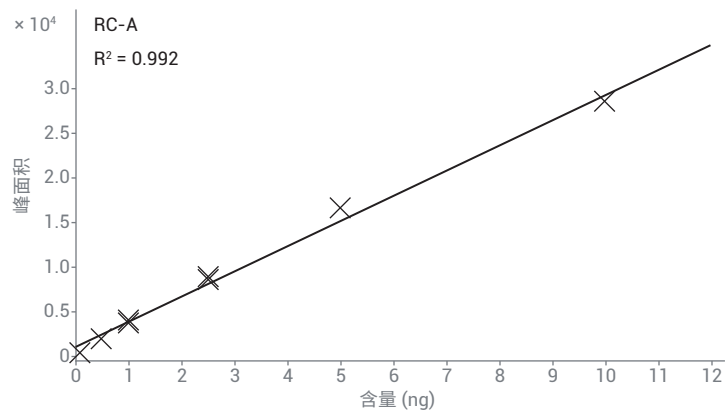
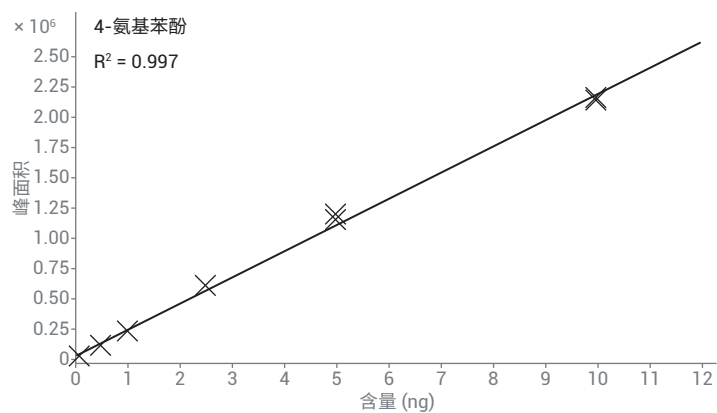
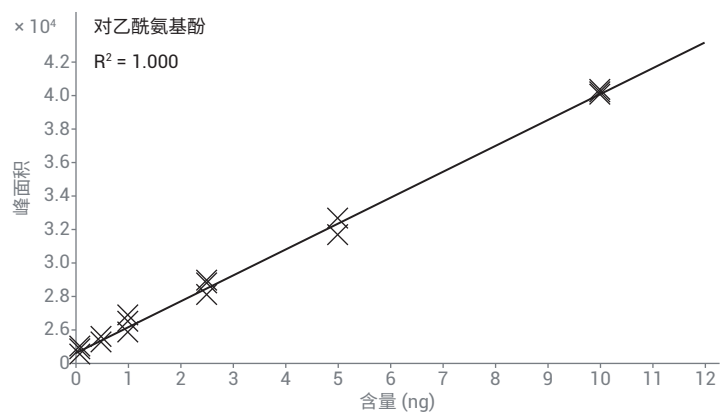


图2. 表1中列出的API和杂质的外标校准曲线。所有目标化合物均测定3次, $R^2 > 0.99$

分流药物 API 对于保护 MS 检测器至关重要

LC/MSD iQ 设计有内置分流阀，可在存在高浓度样品时方便分析杂质，并确保 MS 检测器的寿命和耐用性。为避免 MS

检测器过饱和，由于样品中 API 浓度很高 (50 mg/mL)，当 API 洗脱时，在 DAD 之后将液流导入废液。首先，在流路中没有 MS 的情况下测量样品，以确定应分流 API 的时间窗口 (图 3)。

内置 LC/MSD iQ 分流阀设置为从 2.5 分钟到 3.5 分钟时将液流导入废液。如图 3 所示，仅分流了 API，并在第一个杂质开始洗脱前将液流切换回质谱仪。

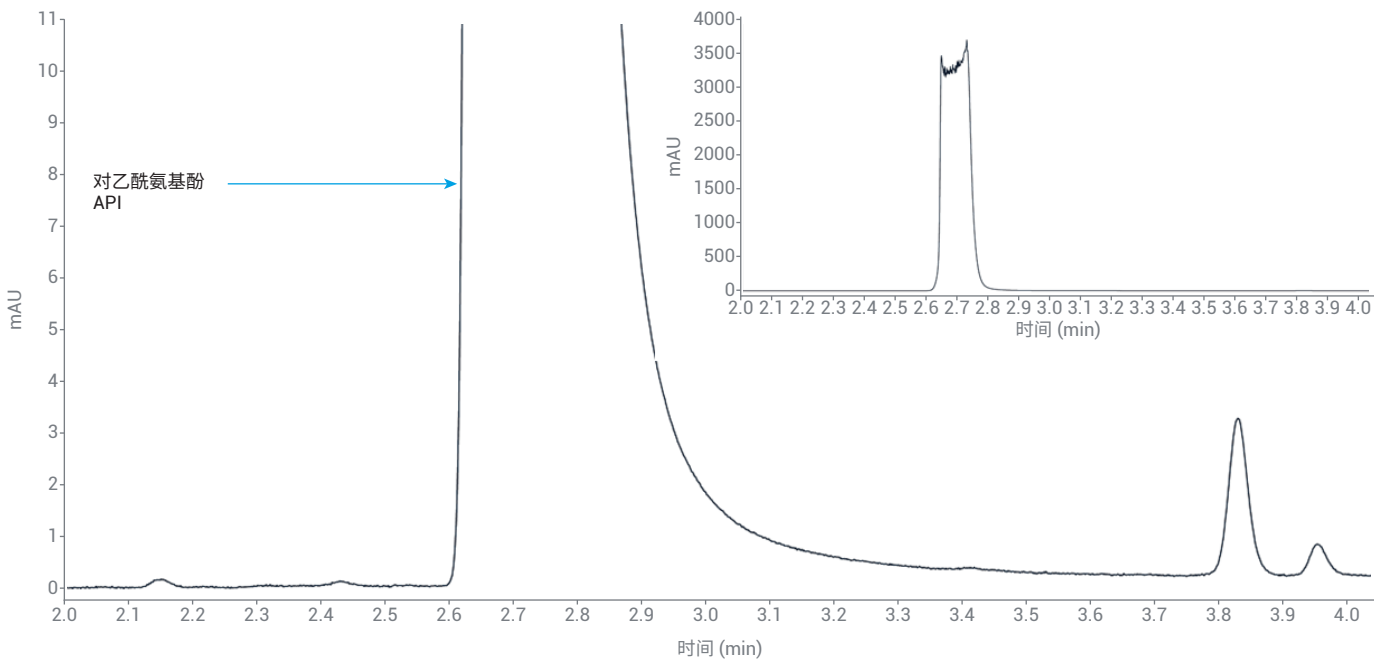


图 3. 1 µL 进样药物样品（含有 50 mg/mL 药物 API 对乙酰氨基酚）的 UV 色谱放大图。插图显示了同一次进样的满量程信号图

鉴定 OTC 样品中的杂质

为了优化液相色谱方法以实现充分分离，分别从标准样品中测量了表 1 中列出的杂质。然后，以 10 µg/mL 浓度进样含有 API 和杂质标准品的混合样品，进样量为 1 µL，以与药物样品进行比较，以确定样品中存在的杂质（图 4）。

测量了 1 µL 进样量的药物样品，以选择性离子监测 (SIM) 模式监测表 1 中列出的所有杂质。图 5 显示药物样品中仅检出部分相关杂质。在药物样品中仅确证了四种杂质：4-氨基苯酚、RC-A、RC-B 和 RC-D。在本研究中，仅比较了相关化合物图谱的 SIM（图 6），不包括配方中的其他成分。

表 1. 标准品 API 和杂质列表

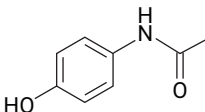
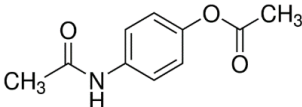
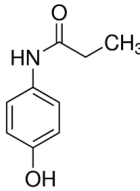
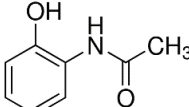
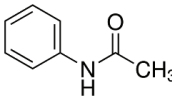
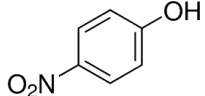
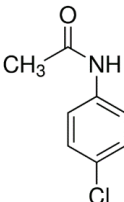
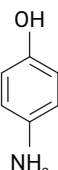
化合物	g/mol	结构
对乙酰氨基酚	151.2	
相关化合物 A	193.2	
相关化合物 B	165.2	
相关化合物 C	151.2	
相关化合物 D	135.2	
相关化合物 F	139.1	
相关化合物 J	169.6	
4-氨基苯酚	109.1	

表 2. Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法参数

参数	HPLC 设定值												
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm, 40 °C (部件号 693975-306)												
流动相 A	0.1% 乙酸水溶液												
流动相 B	0.1% 乙酸甲醇溶液												
梯度	<table><tr><td>时间</td><td>%B</td></tr><tr><td>0</td><td>10</td></tr><tr><td>7</td><td>50</td></tr><tr><td>8</td><td>80</td></tr><tr><td>8.5</td><td>80</td></tr><tr><td>9.0</td><td>10</td></tr></table>	时间	%B	0	10	7	50	8	80	8.5	80	9.0	10
时间	%B												
0	10												
7	50												
8	80												
8.5	80												
9.0	10												
后运行	2.5 min												
流速	0.6 mL/min												
进样量	1 μL												
检测 UV	(265, 5/参比波长360, 80) , (318, 5/无参比)												

表 3. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 参数

参数	单四极杆设定值
离子源	ESI+
峰过滤器	0.02 min
扫描/驻留时间	扫描 100 ms SIM 50 ms
干燥气温度	325 °C
气体流速	10 L/min
雾化器压力	35 psi
毛细管电压	3.5 kV
碎裂电压	90 V
扫描范围	m/z 100–300
SIM 离子	m/z 110、152、194、166、136、140、170

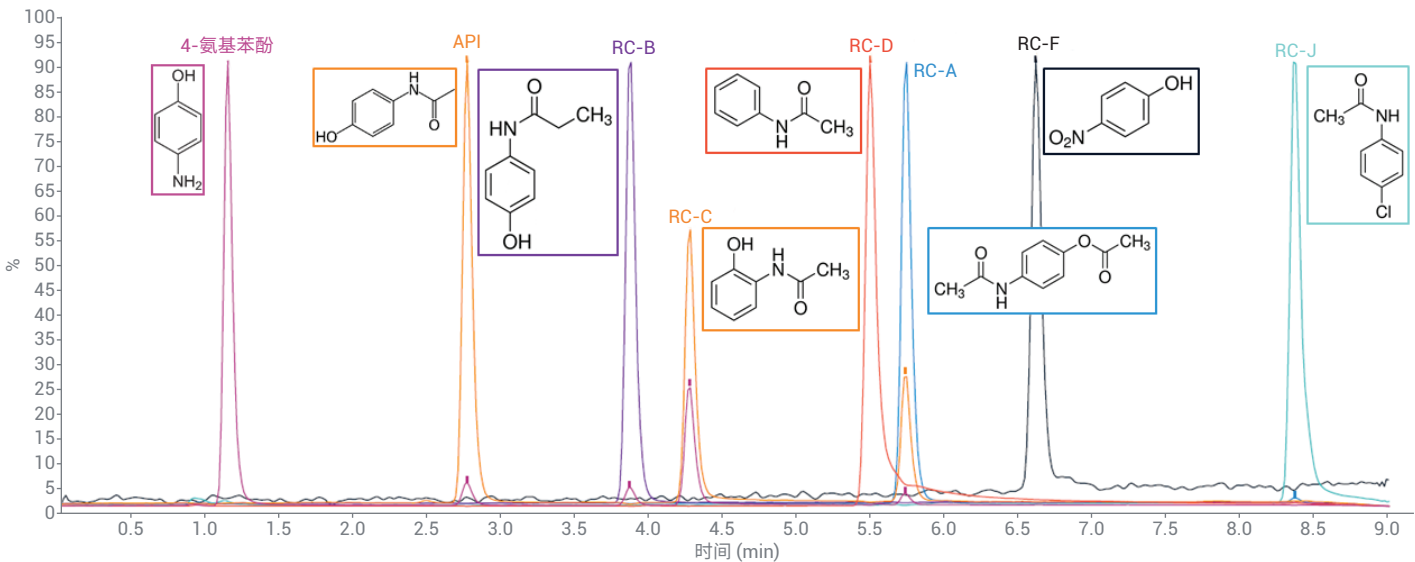


图 4. 1 μL 进样量的 API 和杂质标准品 (10 μg/mL) 的 SIM 质谱图。每个峰采用不同颜色标记。刻度设为相对丰度，以便清晰观察到每个峰

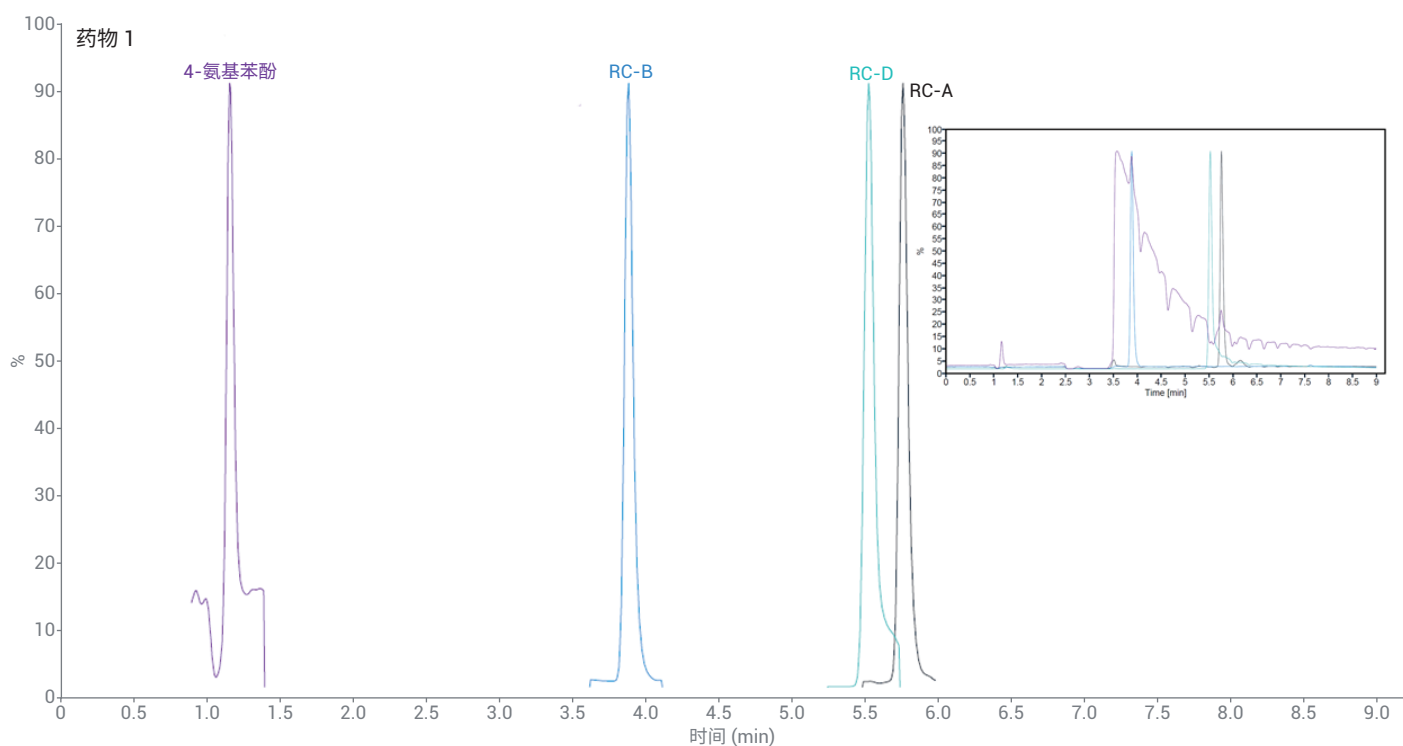


图 5. 1 μL 进样量的药物 1 样品 (含 50 mg/mL API) 的选定 SIM 提取离子色谱 (EIC) 质谱图。为清晰起见, 各 SIM 信号选取 ± 0.5 min 的宽度, 插图显示了完整的 SIM TIC 色谱图。插图中的宽峰是在与 4-氨基苯酚相同 m/z (m/z 110) 下检出的残留 API 片段

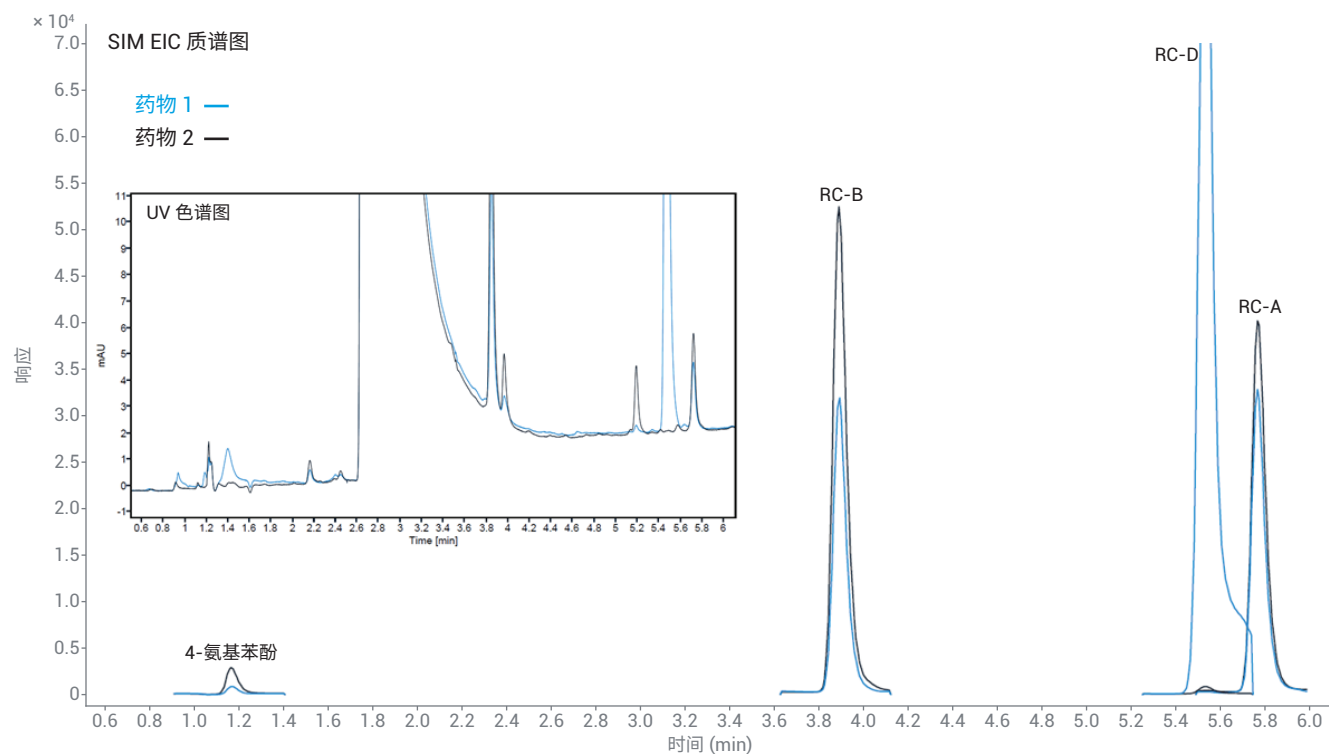


图 6. OTC 药物样品中检出的药物杂质的 SIM EIC 质谱图。蓝色迹线对应药物 1, 黑色迹线对应药物 2。为了清楚起见, 截取保留时间附近的杂质 EIC。插图是相同进样量的 UV 色谱图, 显示了许多与表 1 中杂质无关的其他化合物

比较品牌药和仿制 OTC 药样品

图 6 显示了药物样品 1 和 2 之间针对测量的标准品杂质的对比：4-氨基苯酚、RC-A、RC-B 和 RC-D。其中最受关注的是 RC-D，它在药物 1 中的丰度比在药物 2 中的丰度高得多。然而，对于 4-氨基苯酚、RC-B 和 RC-A，药物 2 中的杂质总丰度更大。表 4 显示了各药物样品中相对 API 检出的杂质含量 (ppm)。尽管这些含量远低于 USFDA 推荐的准则^[3]，但表明了品牌药和仿制药之间的杂质成分存在明显差异。

表 4. 相对 API 的药物样品中杂质含量 (ppm)。较高浓度以粗体显示

杂质	药物 1 相对 API 的 ppm	药物 2 相对 API 的 ppm
4-氨基苯酚	0.440*	1.586*
RC-A	3.010	4.960
RC-B	4.260	14.72
RC-D	21.32	未检出
RC-C	未检出	未检出
RC-F	未检出	未检出
RC-J	未检出	未检出

* 低于最低校准浓度，外推得出

结论

Agilent LC/MSD iQ 可以轻松检出 OTC 药品中存在的低至皮克级柱上量 (ng/mL) 的杂质，并进行对比。该品牌药含有四种可检出杂质：4-氨基苯酚、RC-A、RC-B 和 RC-D，而仿制药含三种可检出杂质：4-氨基苯酚、RC-A 和 RC-B。即使对品牌药的分析显示存在更多检出杂质，但仿制药中这些杂质的浓度更高。两种 OTC 产品均按照 USFDA 指南^[3] 生产，且杂质浓度远低于指南中规定的浓度：15 µg/mL 或 0.03% API。在这些浓度下 (参见表 4)，UV 检测器无法可靠地定量这些杂质。此外，在两种 API 之间观察到的杂质谱差异可以归因于原材料来源以及制造过程中使用的合成和纯化工艺差异。

参考文献

1. Generic Drugs. <https://www.fda.gov/drugs/buying-using-medicine-safely/generic-drugs>. USFDA, May 16, 2019. Retrieved July 22, 2019
2. Acetaminophen USP Monograph. The United States Pharmacopeia Convention. May 1, 2014
3. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products. ICH, July 2006, Rev. 2

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 10 月 8 日，中国出版
5994-1431ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

